

تأثیر فروزین و AQS بر کاهش زیستی هماتیت در حضور باکتری شونلا

نسرین قربانزاده^{۱*} - امیر لکزیان^۲ - غلامحسین حق‌نیا^۳

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۵

چکیده

کاهش آهن در کانی‌های آهن‌دار فرایندی مهم در رفتار آلاینده‌ها می‌باشد و درک عوامل مؤثر بر این فرایند در بهبود اصلاح زیستی آلاینده‌ها حائز اهمیت خواهد بود. یکی از عوامل مؤثر بر کاهش آهن مواد آلی می‌باشند که با سازوکارهای انتقال الکترون و کمپلکس کردن، کاهش زیستی آهن فریک را در حضور باکتریهای کاهنده آهن افزایش می‌دهند. از این رو به منظور بررسی این سازوکارها در فرایند کاهش زیستی هماتیت از AQS به عنوان ناقل الکترون و از فروزین به عنوان کمپلکس‌کننده استفاده شد. آزمایشی با ۱۲ تیمار شامل دو شاهد (بدون باکتری و همراه با باکتری) و پنج سطح فروزین (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار) و پنج سطح AQS (۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در حضور باکتری *Shewanella sp* و سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در محیط کاملاً بی‌هوازی انجام شد. نتایج حاصل از انجام آزمایش نشان داد که بیشترین کاهش زیستی آهن فریک در تیمارهای حاوی فروزین در سطح ۲ میلی‌مولار و در تیمارهای دارای AQS در سطح ۵۰ میکرومولار مشاهده شد. فروزین پس از ۵ روز و AQS پس از یک روز بیشترین تأثیرگذاری را بر کاهش زیستی آهن فریک در کانی هماتیت نشان دادند. لذا کمپلکس کردن و انتقال الکترون بر کاهش زیستی آهن فریک در هماتیت اثر افزایشی داشتند.

واژه‌های کلیدی: کاهش زیستی آهن فریک، فروزین، AQS

مقدمه

بوده و می‌توانند مزوفیلیک، ترموفیلیک و یا هایپرترموفیلیک باشند. از بین این باکتریهای کاهنده، باکتری *Shewanella spp* به دلیل تطبیق‌پذیری بالای فعالیت‌های متابولیکی، اثر گذاشتن بر روی حالت اکسایش و کاهش فلزات (۸ و ۱۳)، و توانایی زیاد برای استفاده از یک گستره وسیعی از ترمینال‌های پذیرنده الکترون مورد توجه و استفاده قرار گرفته است (۶، ۹ و ۳۰). لذا فراوانی کانی‌های حاوی آهن فریک و توانایی این باکتریهای کاهنده سبب شده است که کاهش زیستی آهن فریک در سیستم‌های طبیعی به مقدار زیادی رخ دهد (۲۷). از آنجا که این فرایند اهمیت چشمگیری در فرایند اصلاح زیستی درجا و همچنین ناپویا کردن و یا کاهش سمیت گستره وسیعی از آلاینده‌های آلی و غیرآلی دارد، بنابراین اعمال روشهایی که این فرایند را بهبود بخشد از نقطه نظر زیست محیطی حائز است (۵، ۱۲، ۲۰ و ۲۸). تحقیقات نشان داده است که مواد آلی معمولاً با سه سازوکار، حذف ضرورت تماس مستقیم بین سلول باکتری و کانی‌های حاوی آهن فریک، کمپلکس کردن آهن (II) تولید شده در فرایند کاهش زیستی و افزایش قابلیت دسترسی به آهن فریک موجود در ساختمان کانی سبب افزایش فرایند کاهش زیستی می‌شوند (۲). آهن (II) تولید شده در فرایند کاهش زیستی می‌تواند جذب سطوح کانی و سلول‌های

کانی‌های رسی که بخش عمده‌ای از خاکها و رسوبات را تشکیل می‌دهند در بسیاری از فرایندهای زیست محیطی تأثیرگذار می‌باشند. معمولاً عنصر آهن همراه بسیاری از کانی‌های رسی است (۱۱) و حالت‌های مختلف اکسیداسیون آن تا حدودی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کانی‌های رسی را زیر تأثیر قرار می‌دهد. از نقطه نظر بیوژئوشیمی کاهش آهن فریک که به طور گسترده‌ای در سیستم‌های طبیعی به دو طریق شیمیایی و زیستی رخ می‌دهد، بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۷ و ۲۰). در سالهای اخیر، توجه زیادی به کاهش زیستی آهن فریک در کانی‌ها و نقش کاتالیزوری ریزجانداران در این فرایند معطوف شده است (۲۴). گونه‌های وسیعی از ریزجانداران در محیط‌های زیستی مختلف در این فرایند نقش دارند. باکتریهای کاهنده آهن فریک^۴ (DIRB) معمولاً غیرهوازی اجباری و یا اختیاری

۱، ۲ و ۳ - به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: (Email: nasrin_gh908@yahoo.com)

کننده را بر کاهش زیستی هماتیت مشخص می‌کند و همچنین امکان مقایسه مستقیم این مکانیزم‌های افزایشی را تحت شرایط میکروبی یکسان امکان‌پذیر می‌سازد. با افزایش کاهش زیستی آهن امکان تبدیل آلاینده‌های آلی و غیرآلی به فرم غیر سمی فراهم خواهد شد که گامی مهم در اصلاح مکانهای آلوده خواهد بود.

مواد و روش‌ها

آماده سازی هماتیت

دو نمونه کانی هماتیت از شرکت کانیان مشهد تهیه و پس از آنالیز XRF^۴ و مشخص نمودن مقدار اکسید آهن در این دو نمونه هماتیت، نمونه ۱ به دلیل دارا بودن درصد بالاتر اکسید آهن انتخاب شد (جدول ۱). سپس با انجام عملیات خردایش و نمایش ذرات کانی هماتیت با قطر یک میکرو متر تهیه شد. کانی هماتیت به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا کربن آلی آن حذف شود و از این نمونه برای آزمایشات بعدی استفاده شد.

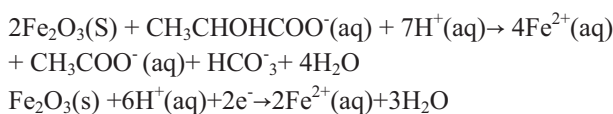
تهیه باکتری و شرایط کشت آن

باکتری *Shewanella sp* از بانک میکروبی ایران (مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران - کرج) تهیه و سپس در محیط کشت مایع TSB^۵ بدون دکستروز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد رشد داده شد. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ (۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جمع‌آوری شدند. سپس سلول‌ها سه بار با فر ۱۰ میلی مولار PIPES^۶ با pH ۶/۸ در محیط بدون اکسیژن شسته شدند. در خاتمه سوسپانسیون باکتری در ۱۵ میلی لیتر بافر PIPES تهیه و چگالی نوری سلول‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین گردید (۲۰).

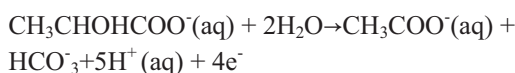
آزمایش کاهش زیستی

آزمایش با ۱۲ تیمار شامل هماتیت (C₁)، هماتیت+ باکتری شونلا (C₂)، هماتیت+ باکتری شونلا + (A₁)۱۰، (A₂)۲۰، (A₃)۳۰، (A₄)۴۰ و (A₅)۵۰ میکرومولار AQS، هماتیت+ باکتری شونلا + (F₁)۰/۵، (F₂)۱، (F₃)۱/۵، (F₄)۲ و (F₅)۲/۵ میلی مولار فروزین بودند که با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به منظور حذف اکسیژن از سیستم آزمایش تمامی مراحل انجام آزمایش در اتاقک حاوی گاز نیتروژن انجام شد.

باکتری شده و این سطوح را غیرفعال نموده و از ادامه کاهش زیستی آهن جلوگیری نماید (۴، ۱۰، ۱۵، ۱۷ و ۱۹). ترکیبات آلی کمپلکس کننده می‌توانند با کمپلکس کردن آهن (II) تولید شده در فرایند کاهش زیستی و انتقال آن از این سطوح سبب افزایش فرایند کاهش آهن شوند (۱۷). فروزین^۱ یکی از مواد آلی کمپلکس کننده ویژه برای آهن (II) است که می‌تواند با توجه به ظرفیت کمپلکس‌کنندگی آن این فرایند را افزایش دهد (۱۷ و ۱۸). حضور ترکیبات قابل حل خارجی فعال با وزن مولکولی پایین و فعال از نظر واکنش‌های اکسایش-کاهش نظیر ترکیبات حاوی کوینون نیز با کاهش نیاز به تماس مستقیم بین سطح کانی و باکتری سبب افزایش فرایند کاهش زیستی آهن فریک می‌شوند (۲ و ۲۰). بنابراین بررسی سازوکارهای کمپلکس نمودن آهن (II) تولید شده زیستی و انتقال الکترون برای افزایش راندمان فرایند کاهش زیستی آهن فریک در اکسیدها (هیدروکسی اکسیدها) و کانی‌های حاوی آهن حائز اهمیت است. از آنجا که در این فرایندهای کاهشی معمولاً آهن فریک در ساختمانی کانی به عنوان پذیرنده الکترون عمل می‌کند بنابر این کانی‌هایی نظیر هماتیت^۲ به دلیل دارا بودن حداقل انحلال آهن در میان اکسی هیدروکسی‌های آهن دار (۱ و ۳) و پایدار بودن از نقطه نظر ترمودینامیکی در محیط، می‌تواند به عنوان پذیرنده الکترون عمل کند (۱ و ۸). ترکیبات آلی نظیر لاکتات، فرمات و گلوکز نیز که به عنوان دهنده الکترون و منبع کربن مطرح هستند، می‌توانند با افزایش رشد باکتری، فرایند زیستی کاهش آهن را در کانی‌های حاوی آهن افزایش دهند (۱). استیوکیومتری اکسایش لاکتات به استات توسط آهن فریک به شکل زیر می‌باشد (۱ و ۲۴).



واکنش کاهش



واکنش اکسایش

در این مطالعه به بررسی اثر ترکیب کوینون دار (AQS)^۳ به عنوان ناقل الکترون و فروزین به عنوان ترکیب کمپلکس کننده آهن (II) در فرایند کاهش زیستی اکسید آهن هماتیت در حضور باکتری شونلا پرداخته شد.

این مطالعه امکان بررسی تأثیرگذاری ناقل الکترون و کمپلکس

1- Ferrozine ((3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,P / -disulfonic acid))

2- Fe₂O₃

3- 9,10-anthraquinone-2-sodium salt

4- X-Ray Fluorescence

5- Tryptic Soy Broth

6- 1,4-piperazinediethanesulfonic acid

جدول ۱- نتایج آنالیز XRF نمونه‌های هماتیت

	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Na ₂ O	MgO	K ₂ O	TiO ₂	MnO	CaO	P ₂ O ₅	Fe ₂ O ₃	SO ₃	LOI
	(درصد)											
نمونه ۱	۱۶/۵۶	۰/۳۵	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۱۱	۰/۰۳	۰/۱۲	۰/۰۴	۰/۰۳	۸۱/۵۶	۰/۰۰	۰/۸۳
نمونه ۲	۲۸/۴۳	۵/۰۳	۰/۴۵	۰/۵۰	۱/۱۳	۰/۳۸	۰/۲۶	۱/۶۵	۰/۰۹	۵۱/۰۹	۱/۸۰	۸/۳۵
	Ba	Co	Cr	Cu	Nb	Ni	U	Th	Ce	Cl		
	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)											
نمونه ۱	۴۵۱	۱۸۳	۴۰۹	۱۵۹	N	۲۰۵	۳	N	۲۰	۶۷۱		
نمونه ۲	۷۱۱	۱۶۰	۴۲۰	۱۴۷	۲۰	۳۲۵	۲۴	۱۰	۸	۸۷۳		
	Pb	Rb	Sr	V	W	Y	Zr	Zn	Mo			
	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)											
نمونه ۱	۱۸۹	۱۵	۲۷	۸۲۶	۱۲۲	۱۵	۲۷	۸۳	۱۵			
نمونه ۲	۹۷	۱۰۰	۱۲۱۷	۴۱۰	۱	۳۰	۳۹۸	۳۴۳۵	۳۳			

نرمال به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و بعد فیلتر شده و با روش فروزین مانند آهن محلول اندازه‌گیری گردید. آهن دو جذب سطحی شده نیز از تفاوت این دو محاسبه شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین داده های آزمایشی با یکدیگر با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که غلظت آهن(II) محلول، قابل استخراج با اسید و جذب سطحی شده در تیمار شاهد_۲ (C_۲) نسبت به شاهد ۱ (C_۱) افزایش معنی‌داری نشان دادند (شکل ۱). آهن(II) زیستی تولید شده در تمامی اشکال در تیمار (C_۲) نسبت به (C_۱) ۶ برابر افزایش داشت. بنابراین باکتری شونلا در شرایط غیرهوازی نقش مؤثری را در فرایند کاهش آهن فریک در هماتیت داشته است.

در مجموع زمان ۵ روز انجام آزمایش مقدار آهن(II) محلول، قابل استخراج با اسید و جذب سطحی شده در تمامی تیمارهای دارای فروزین افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار (C_۲) نشان دادند (شکل ۱). این نتایج نقش فروزین را در فرایند کاهش زیستی نشان می‌دهد. تیمارهای حاوی فروزین با دو سازوکار انحلال آهن(III) فاز جامد و کمپلکس کردن آهن(II) تولید شده سبب افزایش فرایند کاهش زیستی هماتیت می‌شود. در حقیقت با انجام این دو سازوکار از تجمع آهن(II) بر روی سطوح کانی و سلول‌های باکتری جلوگیری می‌شود که این امر منجر به کاهش زیستی بیشتر آهن فریک در هماتیت در مقایسه با تیمارهای فاقد فروزین می‌شود (۵). نتایج حاصل از این

ابتدا ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هماتیت (۲ گرم بر لیتر در بافر PIPES با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) در ظروف شیشه‌ای با گنجایش ۶۰ میلی‌لیتر اضافه و سپس اکسیژن ظروف با تزریق گاز نیتروژن کاملاً خارج و درب پلاستیکی ظروف کاملاً درزگیری شد و به مدت حداقل ۴۸ ساعت به منظور آبیوشی هماتیت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری شونلا (۱۰^۸ سلول در میلی‌لیتر) و ۳ میلی‌لیتر لاکتات با غلظت ۳۰ میلی‌مولار و یک میلی‌لیتر از فروزین یا AQS با غلظت مناسب جهت حصول تیمارهای مورد نظر به کمک سرنگ سترون شده در زیر اتاقک حاوی گاز نیتروژن به ظروف شیشه‌ای اضافه شد تا از عدم حضور اکسیژن اطمینان حاصل شود. سپس نمونه‌ها در تاریکی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد بر روی شیکر مداری (۱۵۰ دور در دقیقه) برای مدت ۵ روز نگهداری شدند. برای یکسان نمودن حجم تیمارهای شاهد با دیگر تیمارها از بافر PIPES استفاده شد.

اندازه‌گیری آهن(II) محلول و استخراج شده با اسید

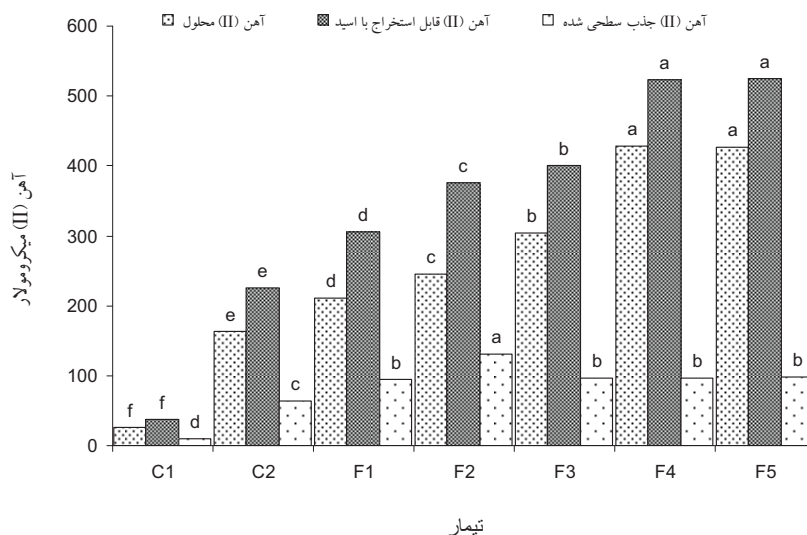
به منظور اندازه‌گیری آهن محلول در زمانهای یک تا ۵ روز ابتدا ۶۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هماتیت-باکتری با سرنگ سترون برداشته شد و از میکروفیلتر (۰/۴۵ میکرومتر) عبور داده و سپس ۶۰۰ میکرولیتر فروزین (۱ گرم بر لیتر فروزین در ۵۰ میلی‌مولار بافر Hepes^۱ در pH ۷) اضافه و رنگ کمپلکس ایجاد شده [Fe(Fz)₃]^{+۲} در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت شد (۲۲).

برای اندازه‌گیری آهن قابل استخراج با اسید در زمانهای یک تا ۵ روز در ابتدا محلول رویی سوسپانسیون در اسید کلریدریک ۰/۵

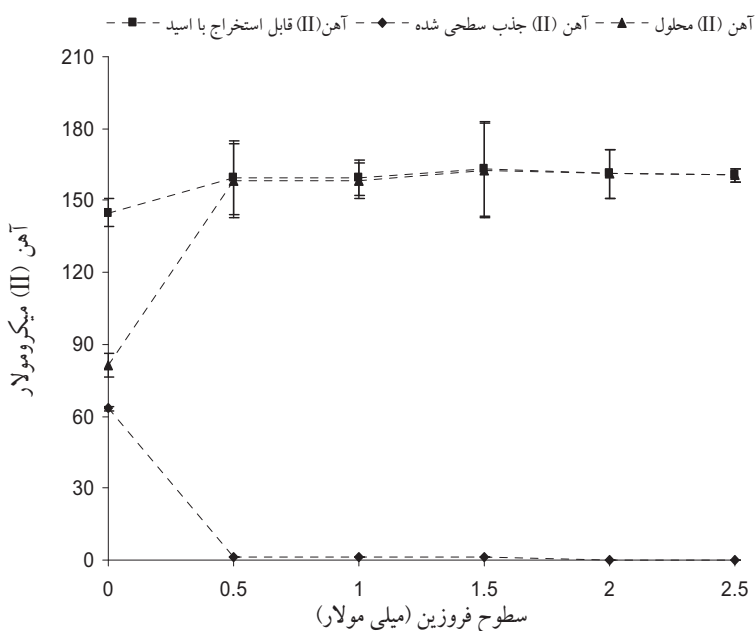
1- N-2-hydroxyethylpiperazine-N / -2-ethanesulfonic acid

میلی مولار فروزین بیشترین مقدار آهن(II) محلول و قابل استخراج با اسید را نشان دادند. به نظر می‌رسد که در شرایط انجام این آزمایش افزایش کاهش زیستی هماتیت به وسیله فروزین تا سطح غلظتی ۲ میلی مولار آن انجام شده و غلظت بالاتر فروزین افزایش معنی‌داری در کاهش زیستی هماتیت نشان ندادند (شکل ۱). رویر و همکاران (۲۰) در بین سطوح غلظتی متفاوت فروزین غلظت ۱/۴۷ میلی مولار آن را بر کاهش زیستی هماتیت مؤثر گزارش نمودند.

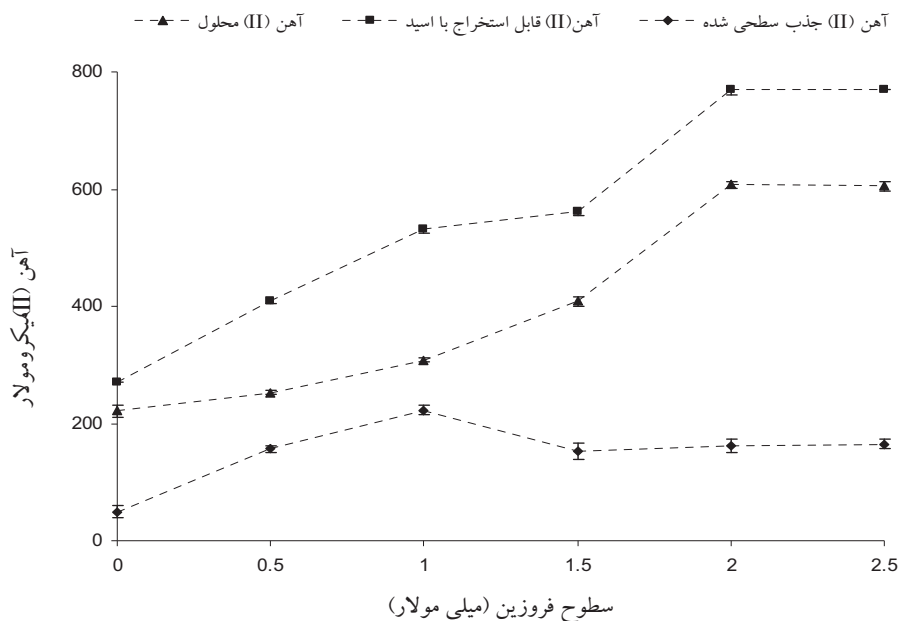
بخش آزمایش با نتایج حاصل از مطالعات رویر و همکاران (۱۷ و ۲۰) و من فرد و همکاران (۱۵) که به بررسی اثر فروزین در فرایند کاهش زیستی پرداخته بودند نیز مطابقت دارد. نتایج حاصل از مطالعات رویر و همکاران (۱۹) نیز که اثر بازدارندگی آهن(II) بر روی کاهش زیستی اکسید آهن را مدل سازی کردند، نشان داد که کاهش آهن فریک فاز جامد ارتباط مستقیم با مکانهای آزاد سطح جامد اکسید آهن دارد و تجمع آهن(II) بر روی سطح جامد اکسید آهن، کاهش زیستی آهن فریک را در سطح این اکسید آهن مسدود می‌کند. تیمارهای ۲ و ۵/۲



شکل ۱- مقایسه میانگین‌های شکل‌های مختلف آهن(II) در تیمارهای دارای فروزین در مجموع ۵ روز انجام آزمایش (هر کدام از شکل‌های آهن بطور جداگانه مقایسه آماری شده اند)



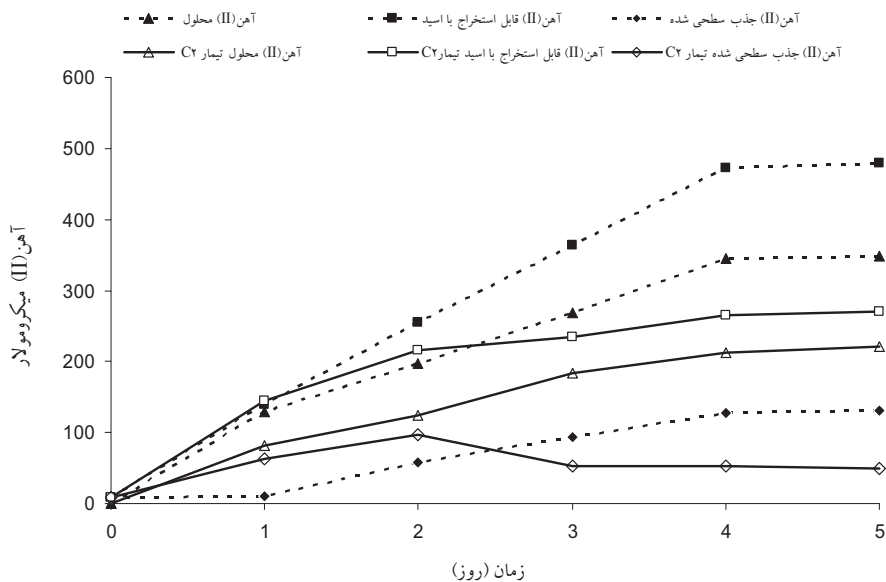
شکل ۲- مقایسه میانگین‌های اشکال مختلف آهن(II) در تیمارهای دارای فروزین پس از گذشت ۱ روز



شکل ۳- مقایسه میانگین‌های اشکال مختلف آهن(II) در تیمارهای دارای فروزین پس از گذشت ۵ روز

نتایج همچنین نشان داد که مقدار افزایش آهن(II) محلول و جذب سطحی شده در زمان ۵ روز تفاوت معنی داری را با زمان ۴ روز نشان نداد ولی این افزایش در مقدار آهن(II) قابل استخراج با اسید در زمان ۵ روز اختلاف معنی داری را با زمان ۴ روز نشان داد (شکل ۴).

بررسی روند تولید آهن(II) تولید شده زیستی در تیمارهای دارای سطوح غلظتی متفاوت فروزین در طول مدت زمان انجام آزمایش نشان داد که مقدار آهن(II) تولید شده در طول زمان افزایشی بود. این افزایش پس از گذشت یک روز قابل توجه نبود ولی پس از گذشت ۵ روز به بیشترین مقدار آهن(II) تولید شده رسید (شکل ۲ و ۳).

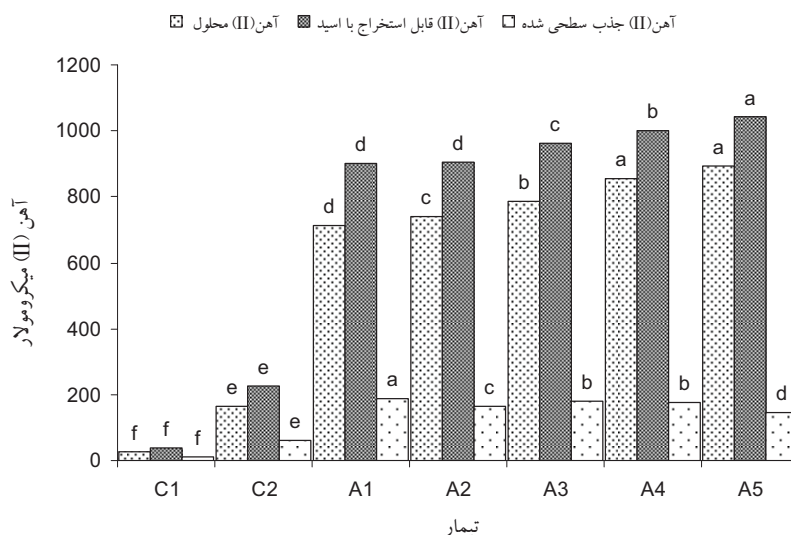


شکل ۴- مقایسه میانگین‌های اشکال مختلف آهن(II) در تیمارهای دارای فروزین در طی ۵ روز انجام آزمایش

خواهد گرفت ولی افزودن ناقل الکترون به این سیستم کاهش منجر به افزایش این فرایند شده است. از آنجا که ترکیب کوبینون دار AQS با گرفتن الکترون از سلول باکتری کاهش زیستی می‌یابد و به هیدروکوبینون تبدیل می‌شود و سپس با انتقال الکترون به آهن(III) در سطح اکسید آهن هماتیت آن را به آهن(II) کاهش داده و دوباره اکسید شده و به شکل اولیه بازگردد که این امر می‌تواند منجر به افزایش کاهش زیستی هماتیت نسبت به تیمار شاهد شود (۱۵). علاوه بر این، ناقل‌ها امکان دسترسی به مکانهایی را که باکتری از آنها محروم مانده مانند میکروپورها یا فضای بین لایه‌ای رس را نیز فراهم می‌سازند (۲۰). نتایج حاصل از این بخش با نتایج مطالعات من فرد و همکاران (۱۵) که اثر ناقلین الکترون با مقادیر اندک (میکرومولار) را بر روی کاهش زیستی اکسیدهای آهن فری هیدرات مطالعه نمودند، مطابقت دارد. بوس و همکاران (۱) و رویر و همکاران (۲۰) نیز که اثر AQDS را به عنوان ناقل الکترون در فرایند کاهش زیستی هماتیت مورد مطالعه قرار دادند، نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند. نتایج همچنین نشان داد که آهن(II) محلول و قابل استخراج با اسید با افزایش غلظت AQS افزایش یافت و در تیمار با سطح غلظتی ۵۰ میکرومولار AQS برای آهن(II) محلول و قابل استخراج با اسید بیشترین مقدار بود و برای آهن(II) محلول تولید شده این افزایش به حدود ۵ برابر تیمار (C₂) رسید. مقدار آهن(II) محلول در تیمارهای با سطح غلظتی ۴۰ و ۵۰ میکرومولار AQS معنی‌دار نبود ولی برای آهن(II) قابل استخراج با اسید این دو تیمار افزایش معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۵).

مقایسه اثرات متقابل تیمارهای دارای فروزین در طی زمان انجام آزمایش نشان داد که تیمارهای با سطح غلظتی ۲ و ۲/۵ میلی‌مولار فروزین در زمانهای ۴ و ۵ روز پس از انجام آزمایش اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و بیشترین مقدار آهن(II) محلول و قابل استخراج با اسید در این زمانها مشاهده شد. محققین دیگر نیز گزارش نمودند که تیمارهای دارای فروزین پس از گذشت ۵ روز بیشترین تأثیر را بر مقدار تولید آهن(II) داشته‌اند (۲۰). لذا نتایج نشان داد که فروزین بر فرایند کاهش زیستی هماتیت در ابتدای انجام آزمایش تأثیر زیادی ندارد، اگرچه از جذب سطحی آهن(II) زیستی تولید شده بر روی سطح هماتیت و سلول جلوگیری می‌کند (۱۹). افزایش آهن(II) در حضور فروزین پس از ۵ روز در مقایسه با روز اول نشان می‌دهد که کمپلکس شدن آهن(II) به مقدار زیادی بر ارتقاء کاهش زیستی هماتیت تحت شرایط آزمایش بسیار مؤثر بوده است (شکل ۴). افزایش بسیار اندک آهن(II) تولید شده در روز اول در تیمارهای دارای فروزین نشان می‌دهد که فروزین زمانی می‌تواند در سیستم تأثیرگذار باشد که آهن(II) به اندازه کافی تولید شده باشد (۱۹ و ۲۰).

بررسی اثر AQS بر کاهش زیستی هماتیت نشان داد که در مجموع ۵ روز زمان انجام آزمایش تمامی تیمارهای دارای AQS در مقدار آهن(II) محلول، قابل استخراج با اسید و جذب سطحی شده افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار (C₂) نشان دادند (شکل ۵). مطالعات مارسیلی و همکاران (۱۶) و وُن کانسستین و همکاران (۲۶) نشان داد که گونه‌های باکتری شونلا قادر به ترشح ترکیبات منونوکلوئید فلاوین و ریوفلاوین بوده که خود ناقل الکترون می‌باشند لذا در تیمار (C₂) بدون افزودن ناقل نیز کاهش زیستی صورت



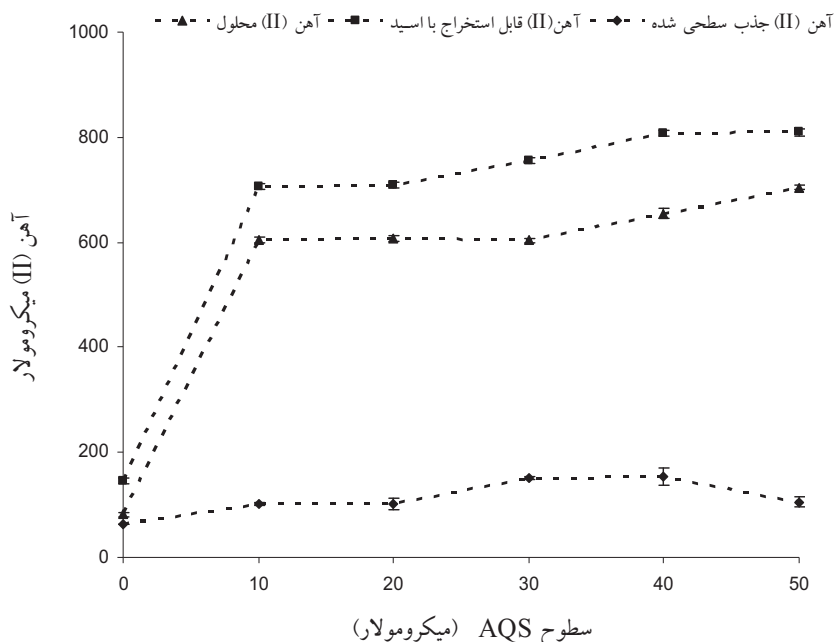
شکل ۵- مقایسه میانگین‌های شکل‌های مختلف آهن(II) در تیمارهای دارای AQS در مجموع ۵ روز انجام آزمایش (هر کدام از شکل‌های آهن بطور جداگانه مقایسه آماری شده اند)

به وسیله دو پارامتر پتانسیل ردکس (اکسایش و کاهش) ناقل الکترون و انرژی آزاد گیبس در دو مرحله انجام واکنش کنترل می-شود. تحقیقات انجام شده نشان داده که از لحاظ ترمودینامیکی، انرژی گیبس مورد نیاز هر دو مرحله انتقال الکترون توسط ناقل در فرایند کاهش زیستی توسط جفت اکسایشی و کاهش کوبینون و هیدروکوبینون تأمین می‌شود و لذا AQS امکان انتقال الکترون را به مقدار زیادی دارا می‌باشد (۱۵ و ۲۵). علاوه بر این ترکیب کوبینون دار AQS دارای پتانسیل‌های اکسایش و کاهش مشابه با ترکیبات ترشح شده از گونه‌های باکتری شونلا می‌باشند که حضور آنها در واکنش-های کاهش زیستی اثر مثبت و افزایشی خواهد داشت (۱۴، ۲۱ و ۲۶).

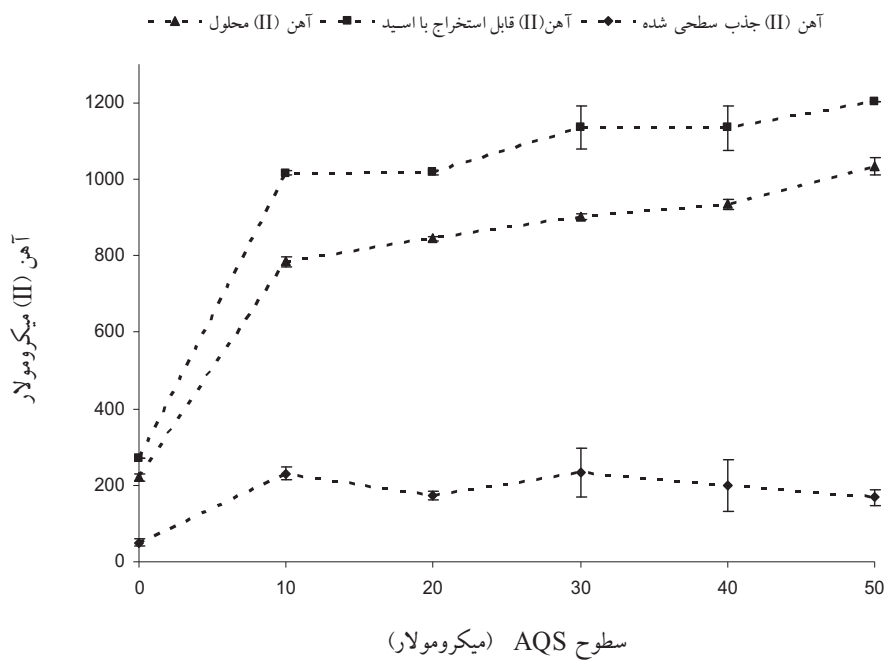
لذا با توجه به نتایج عنوان شده بیشترین مقدار کاهش زیستی هماتیت در تیمارهای دارای فروزین پس از ۵ روز و در تیمارهای دارای AQS پس از یک روز مشاهده شد (شکل ۹). به طور کلی می‌توان عنوان نمود که هم عامل کمپلکس کننده آهن (II) (فروزین) و هم عامل ناقل الکترون (AQS) گستره کاهش زیستی آهن فریک در هماتیت را افزایش می‌دهند. لذا هم فرایند کمپلکس کردن آهن (II) (۱۵) و هم انتقال الکترون بین سلول باکتری و سطح اکسید آهن هماتیت امکان‌پذیر می‌باشد (۴).

بررسی روند تولید آهن (II) تولید شده زیستی در تیمارهای دارای سطوح غلظتی متفاوت AQS در طول مدت زمان ۵ روز انجام آزمایش نشان داد که بیشترین مقدار آهن (II) تولید شده زیستی در طی یک روز پس از شروع آزمایش رخ داد. البته روند افزایش آهن (II) تا ۵ روز ادامه داشت ولی بیشترین تأثیر AQS در کاهش زیستی هماتیت در همان روز اول حاصل شد (شکل ۶ و ۷). دیگر پژوهشگران نیز روند تولید آهن (II) را در رابطه با ناقل الکترون AQDS و دیگر مواد آلی که توانایی انتقال الکترون را دارند مطالعه و نتایج مشابهی را گزارش نمودند (۱۷ و ۲۰). من فرد و همکاران (۱۵) نیز که اثر ترکیبات مختلف کوبینون دار را بر کاهش زیستی آهن فریک در فری هیدراتهای متفاوت توسط باکتری *Geobacter* بررسی نمودند، بیشترین مقدار تولید آهن (II) تولید شده زیستی را در زمان ۲۴ ساعت اولیه انجام آزمایش گزارش نمودند.

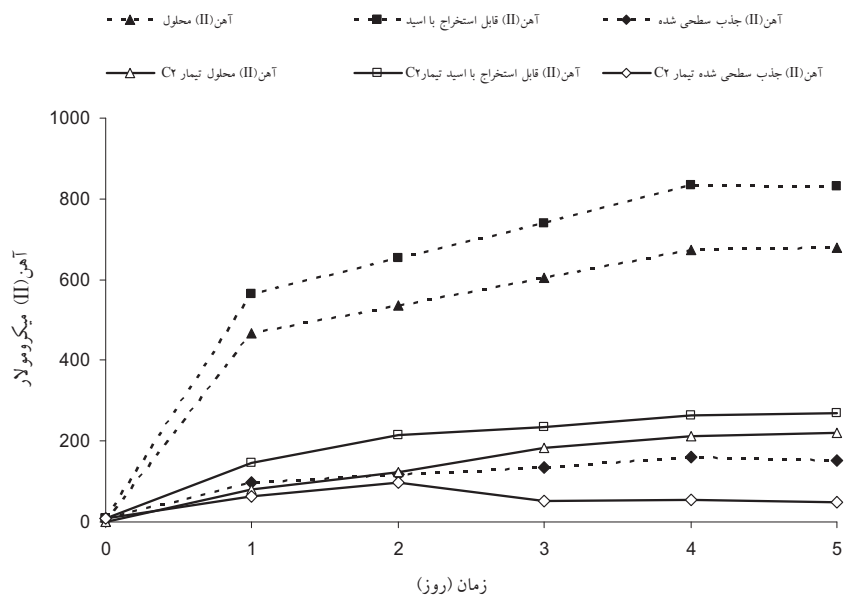
مقایسه اثرات متقابل تیمارهای دارای AQS در طی زمان انجام آزمایش نشان داد که بیشترین مقدار آهن (II) محلول و قابل استخراج با اسید در تیمار با سطح غلظتی ۵۰ میکرومولار AQS در زمانهای ۴ و ۵ روز بود (شکل ۸). پژوهشگرانی که کاهش زیستی اکسیدهای آهن همراه شده با ناقل‌های الکترون از جمله AQS را مورد مطالعه قرار دادند، بیان نمودند که تأثیر ناقل الکترون بر فرایند کاهش زیستی



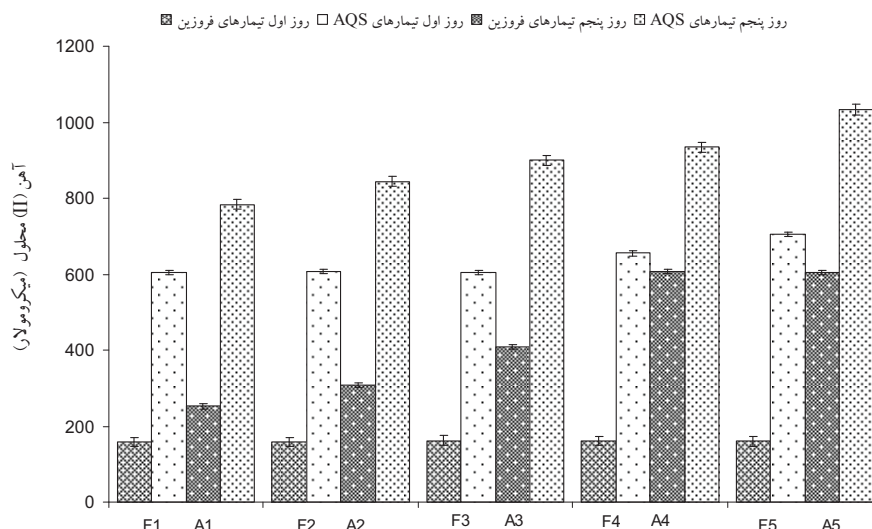
شکل ۶- مقایسه میانگین‌های اشکال مختلف آهن (II) در تیمارهای دارای AQS پس از گذشت ۱ روز



شکل ۷- مقایسه میانگین‌های اشکال مختلف آهن (II) در تیمارهای دارای AQS پس از گذشت ۵ روز



شکل ۸- مقایسه میانگین‌های اشکال مختلف آهن (II) در تیمارهای دارای AQS در طی ۵ روز انجام آزمایش



شکل ۹- مقایسه میانگین‌های آهن (II) محلول تیمارهای دارای فروزین و AQS در زمانهای اول و پنجم انجام آزمایش

خواهد شد. لذا پس از بررسی عوامل مؤثر بر فرایند کاهش آهن فریک، مطالعه تأثیر این فرایند بر کاهش اثرات سوء زیست محیطی و سمیت آلاینده‌های آلی و غیرآلی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که امکان این تحقیق را فراهم کردند تشکر می‌کنیم.

دیدگاههای آینده

کاهش آهن پروسه‌ای مهم در اصلاح آلاینده‌ها می‌باشد. این فرایند دارای پتانسیلی است که در اصلاح زیستی آلاینده‌های غیرآلی مانند کروم، اورانیوم، تکنوتیوم، ترکیبات رادیونوکلئوتید و آلاینده‌های آلی مانند ترکیبات آلیفاتیک کلردار و نیتروآروماتیک بسیار مفید می‌باشد. آهن (II) تولید شده در فرایند کاهش قادر به انجام واکنشهایی با آلاینده‌ها می‌باشد که این امر منجر به تغییراتی در پتانسیل اکسایش و کاهش آلاینده‌ها، غیرمتحرک کردن و کاهش سمیت آنها

منابع

- 1- Bose S., Michael F, Hochella Jr., Yuri A., David W., Kennedy D.E., McCready A.S., and Madden B.H.L. 2009. Bioreduction of hematite nanoparticles by the dissimilatory iron reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73:962-976.
- 2- Bridge T.A.M., and Johnson D.B. 2000. Reductive dissolution of ferric iron minerals by *Acidiphilium* SJH. *Geomicrobiology Journal* 17:193-206.
- 3- Cornell R.M., and Schwertmann U. 1996. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. VCH.
- 4- Deb P.J, Hailiang D., and Chongxuan L. 2007. Influence of biogenic Fe(II) on the extent of microbial reduction of Fe(III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71:1145-1158.
- 5- Fubo L., Burgos W., Xie L., and Zhou Q. 2010. Bioreduction of nitrobenzene, natural organic matter, and hematite by *Shewanella putrefaciens* CN32. *Environ. Sci. Technol.* 44: 184-190.
- 6- Gu B., Yan H., Zhou P., and Watson D.B. 2005. Natural humics impact uranium bioreduction and oxidation. *Environ. Sci. Technol.* 39: 5268-5275.
- 7- Hailiang D., Deb P.J, Jinwook K., and Gengxin Z. 2009. Microbe-clay mineral interactions. *American Mineralogist*, 94: 1505-1519.
- 8- Hansel C.M., Benner S.G., Nico P., and Fendorf S. 2004 Structural constraints of ferric (hydr)oxides on dissimilatory iron reduction and the fate of Fe(II). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68: 3217-3229.
- 9- Heidelberg J.F., Paulsen I.T., Nelson K.E., Gaidos E.J., Nelson W.C., Read T.D., Eisen J.A., Seshadri R., Ward N., Methe B., Clayton R.A., Meyer T., Tsapin A., Scott J., Beanan M., Brinkac L., Daugherty S., Deboy R.T., Dodson R.J., Durkin A.S., Haft D.H., Kolonay J.F., Madupu R., Peterson J.D., Umayam L.A., White O., Wolf A.M., Vamathevan J., Weidman J., Impraim M., Lee K., Berry K., Lee C., Mueller J., Khouri H., Gill J., Utterback T.R., McDonald L.A., Feldblyum T.V., Smith H.O., Venter J.C., Neelson K.H., and Fraser C.M. 2002. Genome sequence

- of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnology* 20: 1118–1123.
- 10- Jeon B.H., Dempsey B.A., Burgos W.D., and Royer R.A. 2001. Reactions of ferrous iron with hematite. *Colloids & Surfaces A*, 191(1-2):41-55.
 - 11- Laguna C., González F., García-Balboa C., Ballester A., Blázquez M.L., and Muñoz J.A. 2011. Bioreduction of iron compounds as a possible clean environmental alternative for metal recovery. *Minerals Engineering*. 24:10-18. Issue 1.
 - 12- Luan F.B., Xie L., Li J., and Zhou Q. 2009. Reduction of nitrobenzene by iron oxides bound Fe(II) system at different pH. *Environ. Sci. Technol.* 7:1937-41.
 - 13- Marshall M.J., Beliaev A.S., Dohnalkova A.C., Kennedy D.W., Shi L., Wang Z.M., Boyanov M.I., Lai B., Kemner K.M., Mclean J.S., Reed S.B., Culley D.E., Bailey V.L., Simonson C.J., Saffarini D.A., Romine M.F., Zachara J.M., and Fredrickson J.K. 2006. C-type cytochrome-dependent formation of U(IV) nanoparticles by *Shewanella oneidensis*. *Plos Biology* 4: 1324–1333.
 - 14- Marsili E., Baron D.B., Shikhare I.D., Coursolle D., Gralnick J.A., and Bond D.R. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 3968–3973.
 - 15- Manfred W., Andeask J., Raineru M. 2009. Effects of humic substances and quinones at low concentrations on ferrihydrite reduction by *Geobacter metallireducens*. *Environ. Sci. Technol.* 43: 5679–5685.
 - 16- Marsili E., Baron D.B., Shikhare I D., Coursolle D., Gralnick J.A., and Bond D.R. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 3968–3973.
 - 17- Royer R.A., Burgos W.D., Fisher A.S., Hunjeon B., Unzrich R., and Dempsey I. 2002. Enhancement of hematite bioreduction by natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* Page Est: 7.5.
 - 18- Royer R.A., Burgos W.D., Fisher A.S., Unz R.F. 2000. In *Proceedings of 220th American Chemical Society National Meeting*; American Chemical Society: Washington, DC, 2000; Vol. 40(2), pp 441-443.
 - 19- Royer R.A., Burgos W.D., Hunjeon B., and Burgos W. 2003. Inhibition of biological reductive dissolution of hematite by ferrous iron. *Environ Sci and Technol.* Page Est: 6.5.
 - 20- Royer R.A., William D., Burgos., A. Fisher A.S., Unz and Dempsey B.R. 2002. Enhancement of biological reduction of hematite by electron shuttling and Fe(II) complexation. *Environ. Sci. and Technol.* Page Est:7.9.
 - 21- Schink B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997, 61: 262–280.
 - 22- Stookey Lawrence L. 1970. Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry* Vol 42. No 7.
 - 23- Straub K.L., Benz M., and Schink B. 2001. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34: 181–186.
 - 24- Stucki J.W., and Kostka J.E. 2006. Microbial reduction of iron in smectite. *C. R. Geoscience* 338:468–475. *Geomaterials (Mineralogy)*.
 - 25- Thauer R.K., Jungermann K., and Decker K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol.* 41: 100–180.
 - 26- Von Canstein H., Ogawa J., Shimizu S., and Lloyd J.R. 2008. Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 615–623.
 - 27- Weiss B., Sturn J., Voglsam S., Strobl S., Mali H., Winter F., and Schenk J. 2011. Structural and morphological changes during reduction of hematite to magnetite and wustite in hydrogen rich reduction gases under fluidized bed conditions. *Iron making and steelmaking*, Volume 38, Number 1,9: 65-73.
 - 28- Wielinga B., Mizuba M.M., Hansel C.M., and Fendorf S.E. 2001. Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Environ. Sci.* 35: 522-527.
 - 29- Yan B., Wrenn B.A., Basak S., Biswas P., and Giammar D.E. 2008. Microbial reduction of Fe(III) in hematite nanoparticles by *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Science and Technology* 42: 6526–6531.
 - 30- Zhengji Y. 2010. Microbial removal of uranyl by sulfate reducing bacteria in the presence of Fe (III) (hydr)oxides. *Journal of Environmental Radioactivity* 101: 700-705.

Effect of Ferrozine and AQS on Bioreduction of Hematite in the Presence of *Shewanella sp.*

N. Ghorbanzadeh^{1*}- A. Lakzian²- Gh. Haghnia³

Received: 21-8-2011

Accepted: 15-1-2012

Abstract

Iron bioreduction in ferric minerals is an important process in behavior and bioremediation of contaminants. Organic matters are effective factors in bioreduction of ferric iron by iron reduction bacteria. They enhance iron reduction in hematite by two mechanisms: complexation and electron shuttling. An experiment was conducted under laboratory conditions in the form of a completely randomized design with 12 treatments and 3 replications to examine the function of AQS (as an electron shuttling) and ferrozine (as a complexing agent). The treatments included two controls (with and without *Shewanella sp.*) and 5 levels of ferrozine (0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5 mM), and 5 levels of AQS (10, 20, 30, 40 and 50 μ M) in the presence of *Shewanella sp.* in anaerobic chamber. The greatest amount of biological reduction of ferric iron was occurred in 2 mM ferrozine and 50 μ M of AQS treatments. Ferrozine after 5 days and AQS after 1 day showed the greatest impact on bioreduction of ferric iron in hematite. So both complexation and electron shuttling had additive effect on the bioreduction of hematite.

Keywords: Bioreduction of ferric iron, Ferrozine, AQS

1,2,3- PhD Student, Associate Professor and Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively

(* - Corresponding Author Email: nasrin_gh908@yahoo.com)